

Optische Kontrolle von TRPV1-Kanälen**

Marco Stein, Andreas Breit, Timm Fehrentz, Thomas Gudermann und Dirk Trauner*

„Transient Receptor Potential“-Kanäle (TRP-Kanäle) bilden eine der größten Ionenkanalfamilien im menschlichen Genom und sind als vielseitige zelluläre Sensoren an der Wahrnehmung von Schmerz, Wärme und Kälte, scharf schmeckenden Substanzen, sowie von Druck beteiligt.^[1] Darüber hinaus sind sie im Sehprozesse involviert und sind möglicherweise für die Regulation des Tag- und Nacht-rhythmus in Säugetieren verantwortlich.^[2] Mitglieder dieser Ionenkanalfamilie nehmen damit eine zentrale Rolle in der Sinnesphysiologie wahr, deren gesamtes Ausmaß noch nicht absehbar ist. Zudem sind TRP-Kanäle an der Regulation von gastrointestinaler Motilität, absorptiven und sekretorischen Prozessen, Blutfluss und mucosaler Homöostase beteiligt.^[1a] Mittlerweile ist bekannt, dass mehrere Krankheiten durch TRP-Kanal-Genmutationen hervorgerufen werden.^[1a] All dies löste in jüngster Zeit intensive akademische und industrielle Forschungsaktivitäten aus, die bereits mehrere molekulare Sonden und Arzneimittelkandidaten lieferten.

Der Vanilloid-Rezeptor 1 (TRPV1) ist einer der wichtigsten und am besten erforschten Repräsentanten der Familie.^[1] Als nichtselektiver Kationenkanal ist er wie die meisten TRP-Kanäle permeabel für Ca^{2+} und unterscheidet nur geringfügig zwischen Mono- und Dikationen.^[3] TRPV1 ist hauptsächlich in schmerzwahrnehmenden Neuronen exprimiert, z.B. im Hinterwurzelganglion (dorsal root ganglion, DRG) und Trigeminusganglion (TG), sowie in spinalen und peripheren Nervenenden und in der Hornhaut.^[1c] Normalerweise befindet sich der Kanal in der Plasmamembran, manchmal jedoch wird dieser auch in intrazellulären Membranen (z.B. sarko-/endoplasmatisches Retikulum) gefunden, wo er als Kanal zur intrazellulären Freisetzung von Ca^{2+} fungieren könnte.^[4] Aktivierung von TRPV1 resultiert in der Wahrnehmung von starkem Schmerz, z.B. bei einer Verbrennung. Der Kanal eignet sich daher als vielversprechendes Ziel zur Entwicklung potenzieller Analgetika. TRPV1 wird durch mehrere chemische wie physikalische Reize stimuliert,

z.B. durch Spannung,^[5] Hitze,^[6] Capsaicin,^[6a] Spinnentoxine,^[7] niedrige pH-Werte,^[8] verschiedene Fettsäuren wie das Endocannabinoid Anandamid,^[9] und er wird durch Phosphorylierung potenziert.^[10] Trotz dieser multimodalen Aktivierungsmechanismen reagiert TRPV1 natürlicherweise nicht auf Licht.

In den letzten Jahren haben wir grundlegende Methoden zur optischen Kontrolle von Rezeptorproteinen entwickelt, indem wir einen photoschaltbaren Liganden entweder kovalent an einen Rezeptor anbrachten (photoswitchable tethered ligand, PTL), oder diesen frei diffundieren ließen (photochromic ligand, PCL).^[11] Beide Konzepte haben wir an spannungsabhängigen Ionenkanälen angewendet, um Herzschlag,^[12] Schmerzwahrnehmung^[13] und Lichtwahrnehmung^[14] in verschiedenen Tieren zu kontrollieren. Darüber hinaus ist es uns gelungen, nikotinische Acetylcholinrezeptoren^[15] sowie ionotrope^[16] und metabotrope Glutamatrezeptoren^[17] in künstliche Photorezeptoren umzuwandeln. Erst kürzlich konnten wir lichtschaltbare Anästhetika basierend auf Propofol entwickeln,^[18] die GABA-induzierte Chloridströme lichtabhängig potenzieren. Hier berichten wir nun über die Entwicklung von Photoschaltern, durch die TRPV1-Kanäle effektiv zu Photorezeptoren umfunktioniert werden.

Unsere Studien basieren auf der hochentwickelten Pharmakologie von TRPV1, die in Abbildung 1 skizziert ist. Das Vanillaminderivat Capsaicin (CAP), verantwortlich für die Schärfe von Chilischoten, ist der bekannteste TRPV1-Ago-nist.^[6a] Das deutlich komplexere Diterpenoid Resiniferatoxin

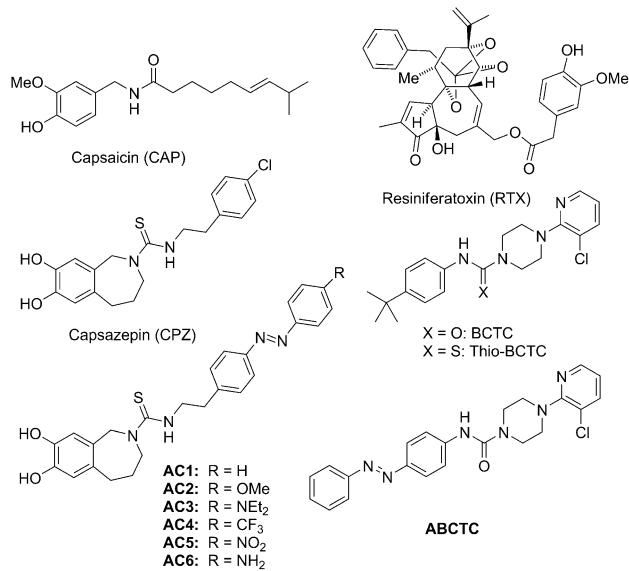


Abbildung 1. Agonisten und Antagonisten von TRPV1 und ihre photoschaltbaren Derivate ABCTC und AC1–6 (untere Reihe).

[*] M. Sc. M. Stein, Dr. T. Fehrentz, Prof. D. Trauner
Department für Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität (LMU)
München und Center of Integrated Protein Science
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)
E-Mail: dirk.trauner@lmu.de

Dr. A. Breit, Prof. T. Gudermann
Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
LMU München, Goethestraße 33, 80336 München (Deutschland)

[**] Wir danken Dr. Peter Mayer (LMU München) für die Bestimmung der Röntgenstruktur und Dr. Martin Sumser (LMU München) für viele hilfreiche Diskussionen. M.S. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Promotionsstipendium. Diese Arbeit wurde unterstützt durch die European Science Foundation (ERC grant No 268795 an D.T.).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201302530> zu finden.

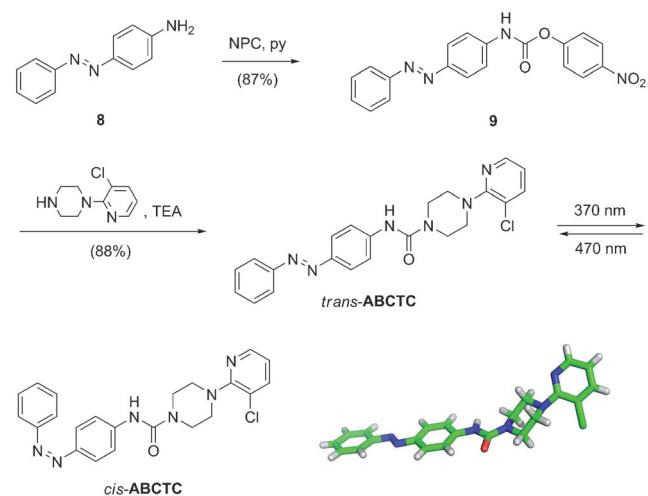
(RTX), isoliert aus dem Kaktus *Euphorbia resinifera*,^[19] wird als die schärfste bekannte Substanz angesehen. Der kompetitive Antagonist Capsazepin (CPZ) wurde 1994 durch Sandoz bei der Untersuchung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) von CAP entdeckt.^[20] Die bis heute spezifischsten TRPV1-Antagonisten sind jedoch BCTC und thio-BCTC.^[21] BCTC wurde durch SAR-Studien 2003^[22] entdeckt und ist seither zum meistverwendeten TRPV1-Antagonist avanciert. Die antagonistischen Effekte von BCTC sind dem CPZ bei CAP-Aktivierung von TRPV1 überlegen, wie auch bei der Aktivierung durch niedrige pH-Werte.

Capsazepin und BCTC beinhalten einen Phenylring mit Chlorid- bzw. *tert*-Butyl-Substituenten in *para*-Position bezüglich des Restmoleküls. In beiden Fällen war bekannt, dass diese Substituenten bis zu einem gewissen Grad verändert werden können, ohne die Aktivität vollständig zu verlieren.^[20b,22] Daher nahmen wir an, dass die Phenylringe zu Azobenzolen erweitert werden können, in der Hoffnung, dass deren *cis*- und *trans*-Konfigurationen Antagonisten mit unterschiedlicher Effizienz ergeben. Anhand dieser Überlegungen entwarfen wir Azobenzolderivate von CPZ und BCTC, die wir Azo-Capsazepines 1–6 (**AC1–6**) und Azo-BCTC (**ABCTC**) nennen und welche eine gewisse Bandbreite photophysikalischer und pharmakologischer Eigenschaften abdecken sollten.

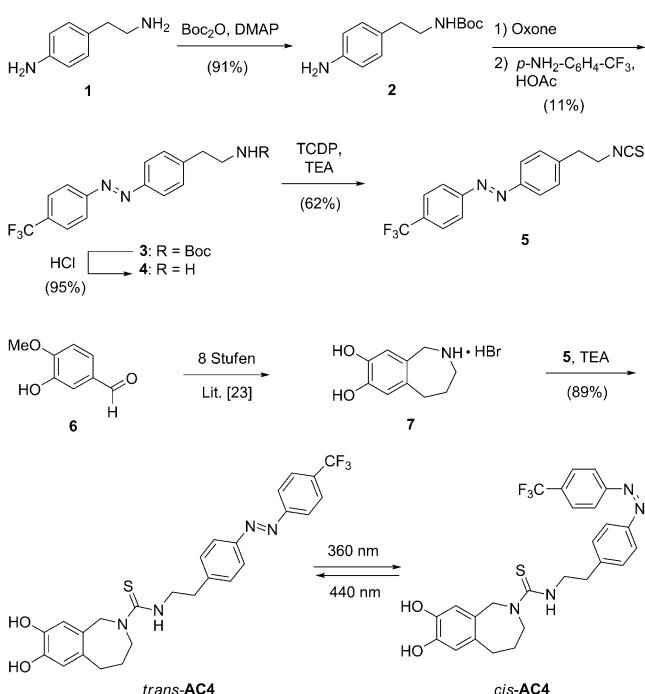
Die Synthese von **AC4**, welches sich später als unsere nützlichste Verbindung herausstellte, ist in Schema 1 gezeigt (für die Synthesen aller anderen AC-Derivate, siehe die Hintergrundinformationen). Zunächst wurde Amin **1** als *tert*-

Butylcarbamat geschützt und das so erhaltene Anilin **2** zum entsprechenden Nitrosoderivat oxidiert. Dieses wurde sofort in einer Mills-Reaktion mit 4-(Trifluormethyl)anilin umgesetzt, wodurch Azobenzol **3** erhalten wurde. Entschützung der Boc-Gruppe ergab das freie Amin **4**, welches mithilfe von 1,1'-Thiocarbonyldi-2(1*H*)-pyridon in das entsprechende Isothiocyanat **5** überführt wurde. **AC4** wurde schließlich durch Addition der Verbindung **5** an das Azepin **7** erhalten, das zuvor in acht Stufen ausgehend von Isovanillin **6** auf Basis einer modifizierten Literaturvorschrift synthetisiert wurde (siehe die Hintergrundinformationen).^[23]

Die Synthese von **ABCTC** begann mit der Kupplung des Anilins **8** mit 4-Nitrophenylchlorformiat. Das so erhaltene Carbamat **9** wurde dann mit 1-(3-Chlorpyridin-2-yl)piperazin umgesetzt und ergab **ABCTC** (Schema 2). Eine Kristallstrukturanalyse von **ABCTC** illustriert die Bedeutung des *o*-Chlorsubstituenten, durch den der Pyridinring aus der Ebene des Piperazinrings gezwungen wird.^[24]



Schema 2. Synthese von ABCTC und dessen Kristallstruktur in der *trans*-Konfiguration; *trans*↔*cis*-Isomerisierung durch Bestrahlung mit 370 nm bzw. 470 nm. NPC = 4-Nitrophenylchlorformiat, py = Pyridin.



Schema 1. Synthese von AC4, das durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 360 nm von seiner *trans*-Form zur *cis*-Form isomerisiert; Rücksomerisierung erfolgt durch 440 nm. Boc = *tert*-Butyloxycarbonyl, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, TCDP = 1,1'-Thiocarbonyldi-2(1*H*)-pyridon, TEA = Triethylamin.

Als nächstes testeten wir unsere Verbindungen auf ihre Aktivität als Antagonisten durch Elektrophysiologie in transient mit TRPV1 transfizierten HEK-Zellen. Dabei nutzten wir zunächst die Spannungsempfindlichkeit von TRPV1.^[5] Unsere Studien ergaben, dass alle sechs AC-Derivate als TRPV1-Antagonisten bei Konzentrationen von 5–100 µM fungieren. Das Trifluormethyllderivat **AC4** erwies sich dabei unter allen Azo-Capsazepinen als der beste photoschaltbare Antagonist. Unter den Bedingungen der Spannungssteuerung wirkt es als *trans*-Antagonist, d.h. es reduziert spannungsaktivierte TRPV1-Ströme stärker bei Bestrahlung durch 440 nm als in der *cis*-Form bei 360 nm (Abbildung 2 a,b). Öffnung des Kanals durch Depolarisation auf +200 mV ermöglicht die schnelle und vollständig reversible Inhibierung von TRPV1-Strömen > 1 nA durch Bestrahlung der 100 µM **AC4** enthaltenden Badlösung mit der entsprechenden Wellenlänge (Abbildung 2 c).

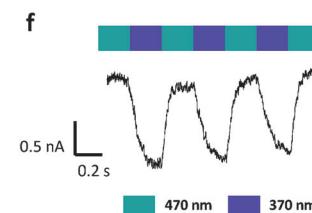
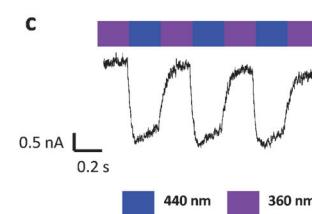
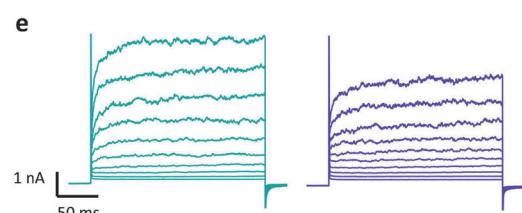
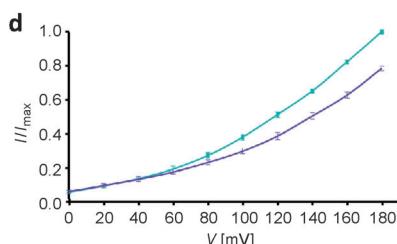
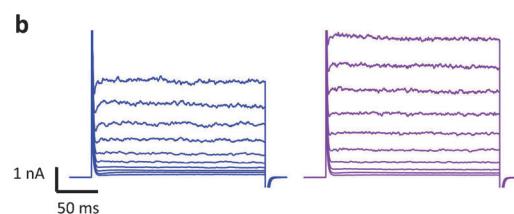
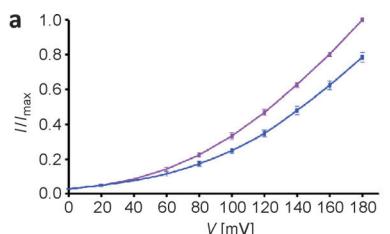


Abbildung 2. a) I/V-Kurven von spannungsaktivierten TRPV1-Kanälen in 20-mV-Stufen auf bis zu +180 mV unter Bestrahlung mit 440 nm (blau) und 360 nm (magenta) von 100 μ M **AC4** (normalisiert auf I_{max} ; $n=6$). b) Repräsentative Einzelmessung aus (a). c) Photoschaltzyklen durch Wellenlängenmodulation bei +200 mV mit 100 μ M **AC4**. d-f) Entsprechende Daten für 10 μ M **ABCTC** durch Bestrahlung mit 370 nm (lila) und 470 nm (türkis).

Im Unterschied zu **AC4** blockte das BCTC-Derivat **ABCTC** mehr TRPV1-Strom in der *cis*-Konfiguration (bei 370 nm) als in der *trans*-Form (bei 470 nm; Abbildung 2d-f). **ABCTC** fungiert daher als reversibler *cis*-Antagonist. Die I/V-Kurven von **AC4** und **ABCTC** erscheinen ähnlich, wobei beide Antagonisten über 20% des maximalen Stroms in der entsprechend aktiveren Form blockieren (*trans*-**AC4** bzw. *cis*-**ABCTC**).

Nachdem die Spannungsaktivierung der Kanäle unter nichtphysiologischen Bedingungen erfolgt, untersuchten wir als nächstes den Effekt unserer photoschaltbaren Antagonisten auf CAP-induzierte TRPV1-Strome mithilfe eines Ca^{2+} -Lumineszenzassays. Während **AC1-3** und **AC5-6** nur geringe antagonistische Effekte bei Aktivierung durch 1 μ M CAP zeigten (IC_{50} -Werte > 50 μ M, siehe die Hintergrundinformationen), waren **AC4** und **ABCTC** deutlich aktiver. Wir erhielten IC_{50} -Werte von (3.1 ± 0.6) μ M für **AC4**, verglichen mit (0.2 ± 0.06) μ M für CPZ bzw. (12.8 ± 0.7) μ M für **ABCTC**, verglichen mit (0.2 ± 0.6) μ M für BCTC (Abbildung 3a,b).

Daraufhin untersuchten wir, ob es möglich ist, auch CAP-induzierte TRPV1-Strome durch **AC4** oder **ABCTC** in lichtabhängiger Weise zu regulieren. Während mit **ABCTC** keine Änderungen durch Licht festgestellt werden konnten, ließ sich der antago-

nistische Effekt von **AC4** in dieser Weise effizient modulieren (Abbildung 3c).

Eine Puff-Applizierung von 100 nm CAP auf transient mit TRPV1 transfizierten HEK-Zellen in 1 μ M **AC4** enthaltender Badlösung führte zu starker Zunahme des TRPV1-Stromes, der durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 360 nm bis zu 82% reduziert werden konnte. Durch Bestrahlung mit 440 nm konnte der ursprüngliche CAP-induzierte Strom wiederhergestellt werden (Abbildung 3c). Dieser Prozess ist vollständig reversibel. Statistische Analysen ($n=8$, $P=0.01$;

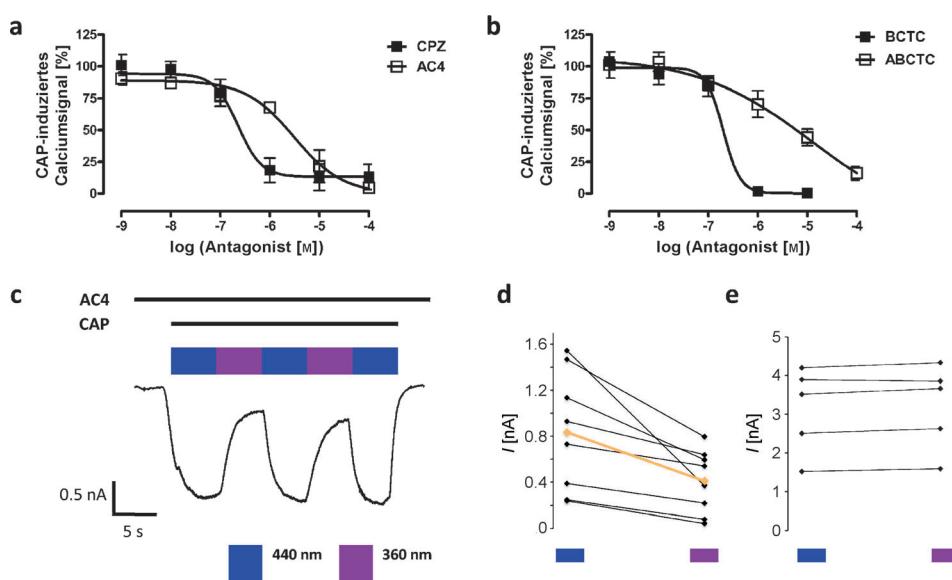


Abbildung 3. a) Dosis-Wirkungs-Kurven von **AC4**, im Vergleich zu CPZ; $n=5$. b) Dosis-Wirkungs-Kurven von **ABCTC**, im Vergleich zu BCTC; $n=5$. c) Photoschaltbarkeit von CAP-induzierten TRPV1-Stromen (100 nm CAP) durch **AC4** (1 μ M) durch Wellenlängenmodulation zwischen 440 nm und 360 nm (Haltepotential -60 mV). d) Statistische Analyse von photoschaltbaren, CAP-induzierten TRPV1-Stromen durch **AC4** (orange = Median). Die Differenz ist signifikant ($P=0.01$, Students t-Test, $n=8$). e) Keine Photoschaltbarkeit von CAP-induzierten TRPV1-Stromen in Abwesenheit von **AC4** ($n=5$).

Students t-Test) lieferten einen Photoschaltindex (photoswitching index; definiert durch das Verhältnis der Stromzunahme nach CAP-Aktivierung bei 360 nm bzw. 440 nm) von 49% (Abbildung 3d). In einem Kontrollexperiment (Abbildung 3e) konnte gezeigt werden, dass Licht alleine, d. h., in Abwesenheit des photoschaltbaren Antagonisten, keinen Einfluss auf den CAP-induzierten Strom hat.

Bemerkenswerterweise fungiert **AC4** als *cis*-Antagonist bei CAP-Induktion von TRPV1-Strömen, wohingegen es bei Spannungsaktivierung als *trans*-Antagonist in Erscheinung tritt. Dies mag zunächst paradox erscheinen, deckt sich jedoch mit der Beobachtung, dass Agonisten mit TRPV1 auf zustandsabhängige Weise wechselwirken, und dass bestimmte Antagonisten spezifische Agonisten unterschiedlich gut hemmen können.^[25] Unsere Studie eröffnet daher neue Möglichkeiten zur Entwicklung modalitätsselektiver Antagonisten, die möglicherweise dabei helfen können, ungewollte Nebenwirkungen von Analgetika zu vermeiden.

Zusammenfassend haben wir eine Methode zur optischen Kontrolle von TRP-Kanalaktivität mithilfe von Azobenzol-derivaten der TRPV1-Antagonisten Capsazepin (CPZ) und BCTC entwickelt. Die sechs CPZ-Derivate **AC1–6** wurden synthetisiert, unter welchen sich das Trifluormethyl-derivat **AC4** als die nützlichste und interessanteste Verbindung herausstellte. **AC4** fungiert als *trans*-Antagonist bei Spannungsaktivierung von TRPV1 und als *cis*-Antagonist bei Stimulation durch Capsaicin (CAP). Ein anderes Azobenzolderivat, **ABCTC**, ist ebenfalls als *cis*-Antagonist nach Spannungsaktivierung von TRPV1 wirksam, hatte jedoch keinen lichtabhängigen Einfluss auf CAP-induzierte Ströme. Unsere photoschaltbaren Verbindungen bieten einen weiteren Aktivierungsmodus für TRPV1-Kanäle und ermöglichen es, TRP-Kanäle mit Licht zu steuern. Insofern ergänzen sie das kürzlich beschriebene photochemisch aktive Molekül „Optovin“, welches an TRPA1-Kanäle über einen anderen Mechanismus wirkt.^[26] Unsere beste Verbindung, **AC4**, zeigt, dass ein photoschaltbarer Antagonist und ein Agonist gemeinsam verwendet werden können. Dies erweitert den Anwendungsbereich der Photopharmakologie und eröffnet eine neue funktionale Dimension der optischen Regulierung von Ionenkanälen mit synthetischen Photoschaltern. Die Anwendung von **AC4**, **ABCTC** und ähnlichen Verbindungen in sinnesphysiologischem Kontext wird zurzeit aktiv untersucht.

Eingegangen am 26. März 2013,
veränderte Fassung am 9. Mai 2013
Online veröffentlicht am 19. Juli 2013

Stichwörter: Azobenzole · Capsaicin · Capsazepin · Photopharmakologie · TRPV1

[1] a) L.-J. Wu, T.-B. Sweet, D. E. Clapham, *Pharmacol. Rev.* **2010**, *62*, 381–404; b) K. Venkatachalam, C. Montell, *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 387–417; c) G. Owsianik, T. Voets, B. Nilius in *Ion Channels from Structure to Function* (Hrsg.: J. N. C. Kew, C. H. Davies), Oxford University Press, New York, **2010**, S. 511.

[2] a) Y. Shen, M. A. F. Rampino, R. C. Carroll, S. Nawy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 8752–8757; b) A. T. Hartwick, J. R.

Bramley, J. Yu, K. T. Stevens, C. N. Allen, W. H. Baldridge, P. J. Sollars, G. E. Pickard, *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 13468–13480.

[3] C. D. Benham, J. B. David, A. D. Randall, *Neuropharmacology* **2002**, *42*, 873–888.

[4] a) H. Turner, A. Fleig, A. Stokes, J.-P. Kinet, R. Penner, *Biochem. J.* **2003**, *371*, 341–350; b) N. Ito, U. T. Ruegg, A. Kudo, Y. Miyagoe-Suzuki, S. Takeda, *Nat. Med.* **2013**, *19*, 101–106.

[5] J. A. Matta, G. P. Ahern, *J. Physiol.* **2007**, *585*, 469–482.

[6] a) M. J. Caterina, M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine, D. Julius, *Nature* **1997**, *389*, 816–824; b) E. Cao, J. F. Cordero-Morales, B. Liu, F. Qin, D. Julius, *Neuron* **2013**, *77*, 667–679.

[7] C. J. Bohnen, A. Priel, S. Zhou, D. King, J. Siemens, D. Julius, *Cell* **2010**, *141*, 834–845.

[8] M. Tominaga, M. J. Caterina, A. B. Malmberg, T. A. Rosen, H. Gilbert, K. Skinner, B. E. Raumann, A. I. Basbaum, D. Julius, *Neuron* **1998**, *21*, 531–543.

[9] a) P. M. Zygmunt, J. Petersson, D. A. Andersson, H. Chuang, M. Sorgard, V. Di Marzo, D. Julius, E. D. Hogestatt, *Nature* **1999**, *400*, 452–457; b) S. W. H. Hwang, J. Kwak, S. Y. Lee, C. J. Kang, J. Jung, S. Cho, K. H. Min, Y. G. Suh, D. Kim, U. Oh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 6155–6160; c) D. Smart, M. J. Gunthorpe, J. C. Jerman, S. Nasir, J. Gray, A. I. Muir, J. K. Chambers, A. D. Randall, J. B. Davis, *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *129*, 227–230.

[10] D. E. Clapham, *Nature* **2003**, *426*, 517–524.

[11] T. Fehrentz, M. Schönberger, D. Trauner, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 12362–12390; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12156–12182.

[12] D. L. Fortin, M. R. Banghart, T. D. Dunn, K. Borges, D. A. Wagenaar, Q. Gaudry, M. Karakossian, T. W. Otis, W. B. Kristan, D. Trauner, R. H. Kramer, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 331–338.

[13] A. Mourot, T. Fehrentz, D. Bautista, D. Trauner, R. H. Kramer, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 396–402.

[14] A. Polosukhina, J. Litt, I. Tochitsky, J. Nemargut, Y. Sychey, I. De Kouchkovsky, T. Huang, K. Borges, D. Trauner, R. N. Van Gelder, R. H. Kramer, *Neuron* **2012**, *75*, 271–282.

[15] I. Tochitsky, M. R. Banghart, A. Mourot, J. Z. Zhao, B. Gaub, R. H. Kramer, D. Trauner, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 105–111.

[16] a) M. Volgraf, P. Gorostiza, R. Numano, R. H. Kramer, E. Y. Isacoff, D. Trauner, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 47–52; b) M. Volgraf, P. Gorostiza, S. Szobota, M. R. Helix, E. Y. Isacoff, D. Trauner, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 260–261; c) S. Szobota, P. Gorostiza, F. Del Bene, C. Wyart, D. L. Fortin, K. D. Kolstad, O. Tulyathan, M. Volgraf, R. Numano, H. L. Aaron, E. K. Scott, R. H. Kramer, J. Flannery, H. Baier, D. Trauner, E. Y. Isacoff, *Neuron* **2007**, *54*, 535–545; d) P. Gorostiza, M. Volgraf, R. Numano, S. Szobota, D. Trauner, E. Y. Isacoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10865–10870; e) R. Numano, S. Szobota, A. Y. Laud, P. Gorostiza, M. Volgraf, B. Roux, D. Trauner, E. Y. Isacoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 6814–6819; f) H. Janovjak, S. Szobota, C. Wyart, D. Trauner, E. Y. Isacoff, *Nat. Neurosci.* **2010**, *13*, 1027–1032; g) P. Stawski, H. Janovjak, D. Trauner, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7759–7772; h) N. Caporale, K. D. Kolstad, T. Lee, I. Tochitsky, D. Dalkara, D. Trauner, R. H. Kramer, Y. Dan, E. Y. Isacoff, J. G. Flannery, *Mol. Ther.* **2011**, *19*, 1212–1219.

[17] J. Levitz, C. Pantoja, B. Gaub, H. Janovjak, A. Reiner, A. Hoagland, D. Schoppik, B. Kane, P. Stawski, A. F. Schier, D. Trauner, E. Y. Isacoff, *Nat. Neurosci.* **2013**, *16*, 507–516.

[18] M. Stein, S. J. Middendorp, V. Carta, E. Pejo, D. E. Raines, S. A. Forman, E. Sigel, D. Trauner, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10652–10656; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10500–10504.

[19] A. Szallasi, P. M. Blumberg, *Neuroscience* **1989**, *30*, 515–520.

[20] C. S. Walpole, S. Bevan, G. Bovermann, J. Boelsterli, R. Breckenridge, J. W. Davies, G. A. Hughes, I. James, L. Oberer, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1942–1954.

[21] H. J. Behrendt, T. Germann, C. Gillen, H. Hatt, R. Jostock, *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *141*, 737–745.

[22] Q. Sun, L. Tafesse, K. Islam, X. Zhou, S. F. Victory, C. Zhang, M. Hachicha, L. A. Schmid, A. Patel, Y. Rotshteyn, K. J. Valenzano, D. J. Kyle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3611–3616.

[23] J. Lee, J. Lee, *Synth. Commun.* **1999**, *29*, 4127–4140.

[24] Röntgenstrukturanalyse von **ABCTC**: $C_{22}H_{21}ClN_6O$, $M_r = 420.895 \text{ g mol}^{-1}$, gelbes Stäbchen, $0.31 \times 0.04 \times 0.03 \text{ mm}^3$, monoklin, $P2_1/c$, $a = 5.9574(2)$, $b = 21.2314(8)$, $c = 15.6580(6) \text{ \AA}$; $\beta = 97.353(2)^\circ$; $V = 1964.20(1) \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $\rho = 1.423 \text{ g cm}^{-3}$, $\mu_{(\text{MoK}\alpha)} = 0.223 \text{ mm}^{-1}$, MoK α -Strahlung ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$), $T = 173 \text{ K}$, $2\theta_{\max} = 48.20^\circ$, 10388 Refl., 3104 unabhängig, 2064 mit $I \geq 2\sigma(I)$, $R_{\text{int}} = 0.0735$, mean $\sigma(I)/I = 0.0625$, 274 Parameter, $R_{(F_{\text{obs}})} = 0.0446$, $R_{\text{w}}(F^2) = 0.1092$, $S = 1.038$, min. und max. verbleibende Elektronendichte: -0.255 , 0.199 e \AA^{-3} ; Datensammlung durch ein Nonius-KappaCCD-Diffraktometer, ausgestattet mit einem rotierenden Anodengenerator (ω -Scans), Strukturlösung mit Direkten Methoden mit SIR97, Strukturverfeinerung mit SHEXL-97. C-gebundene H-Atome wurden geometrisch hinzugefügt und N-gebundene H wurden fixiert auf $0.87(1) \text{ \AA}$ mit $U(\text{H}) = 1.2$ $U(\text{N})$. CCDC-923926 (**ABCTC**) enthält die ausführlichen kristallographischen Daten zu dieser Veröffentlichung. Die Daten sind kostenlos beim Cambridge Crystallographic Data Centre über www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif erhältlich.

[25] H. J. Solinski, S. Zierler, T. Gudermann, A. Breit, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 40956–40971, zit. Lit.

[26] D. Kokel, C. Y. Cheung, R. Mills, J. Coutinho-Budd, L. Huang, V. Setola, J. Sprague, S. Jin, Y. N. Jin, X. P. Huang, G. Bruni, C. J. Woolf, B. L. Roth, M. R. Hamblin, M. J. Zylka, D. J. Milan, R. T. Peterson, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, AOP.